

糖原 (Glycogen) 含量检测试剂盒 (蒽酮比色法) E1029

检测原理:

糖原是由葡萄糖单位构成的高分子多糖,是糖的主要的储存形式之一,主要贮存在肝和肌肉中作为备用能量,分别称为肝糖原和肌糖原。肝糖原可调节血糖浓度,当血糖升高时可在肝脏合成糖原,血糖降低时,肝糖原则分解为葡萄糖以补充血糖。因此,肝糖原对维持血糖的相对平衡十分重要。肌糖原是肌肉中糖的储存形式,在剧烈运动消耗大量血糖时,肌糖原不能直接分解成血糖,必须先分解产生乳酸,随血液循环到肝脏,通过糖异生转变为肝糖原或葡萄糖。

糖原 (Glycogen) 在浓硫酸的作用下可脱水生成糖醛衍生物,后者再与蒽酮作用形成蓝色化合物,与同法处理的标准葡萄糖溶液比色定量。糖原在浓碱溶液中非常稳定,故在显色之前先将组织放入浓碱中加热以破坏其它成分而保留糖原。



产品组成:

编号	名称	50T	100T	保存方式
试剂一	碱溶液	40 mL×1 瓶	40 mL×2 瓶	2-8℃ 保存6个月
试剂二	葡萄糖标准品	1 mL×1 支	1 mL×1 支	2-8℃ 保存6个月
试剂三	蒽酮	50mg×6 支	50mg×12 支	2-8℃ 避光保存6个月

所需仪器及自备试剂:

含 620nm 波长的分光光度计及 1cm 光径比色皿、100℃沸水浴锅、台式低速离心机、双蒸水、浓硫酸、生理盐水 (0.9%) 或 1xPBS (0.01M)、涡旋混匀器、玻璃试管或离心管 (耐硫酸)。

样本处理:

组织样本处理:

1. 取组织样本 (如肝脏或肌肉) 用生理盐水漂洗后,滤纸吸干,称重 (样本重量 \leq 100mg 为宜) 按样本重量 (mg) : 碱液体积(μ L) = 1 : 3, 一起加入试管中,沸水浴煮 20min (每 10min 旋涡震荡混匀一次),流水冷却。

2. 将步骤 1 所得裂解产物配制为样本待测液:

肝糖原待测液为 1%，向步骤 1 所得裂解产物加双蒸水 (ul) = 肝脏重量 (mg) × 96

肌糖原待测液为 5%，向步骤 1 所得裂解产物加双蒸水 (ul) = 肌肉重量 (mg) × 16

脂肪肝样本处理：

1. 取新鲜肝脏样本用生理盐水漂洗后，滤纸吸干，称重（样本重量≤100mg 为宜）。按样本重量 (mg) : 碱液体积(μL) = 1 : 3，一起加入试管中，沸水浴煮 20min（每 10min 漩涡震荡混匀一次），流水冷却。

2. 将步骤 1 所得裂解产物配制为样本待测液：

肝糖原待测液为 5%，向步骤 1 所得裂解产物加双蒸水 (ul) = 肝脏重量 (mg) × 16

3. 检测液除脂：

取步骤 2 制备好的待测液（一般可见检测液上层漂浮有乳白色油状物），按照待测液 (mL) : 氯仿(mL)=4:1 的比例加入，漩涡混匀，3500rpm 离心 10 分钟，取上清用于测定（如含量较高，需稀释后再测定）。

细胞样本前处理：

1. 细胞沉淀的收集（细胞数量在 100 万个以上）：

(1) 悬浮培养的细胞：直接取细胞悬液，1000rpm 离心 10 分钟，弃上清留细胞沉淀。

(2) 贴壁培养的细胞：用胰酶消化细胞，或用细胞刮将细胞刮下，制成细胞悬液，1000rpm 离心 10 分钟，弃上清留细胞沉淀。

在上述细胞沉淀中加入 0.5 ~ 1mL 的 1xPBS pH7.0 ~ 7.4 或生理盐水，轻轻混匀，1000rpm 离心 10 分钟，弃上清留细胞沉淀。

2. 细胞沉淀裂解

(1) 破碎后水解（适用于未知细胞数量或者细胞数量差异较大的样本）：细胞沉淀加入 0.2 ~ 0.5mL 1xPBS pH7.0 ~ 7.4 或生理盐水，冰水浴条件下超声破碎或手动匀浆，不离心，取 0.05mL 加入碱溶液 0.15mL，沸水浴 20 分钟，流水冷却，即为糖原待测液。

(2) 不破碎直接水解（适用于细胞总数相近或不考虑细胞总数的样本）：每管中加入碱溶液 0.225mL，沸水浴 20 分钟，流水冷却，加双蒸水 0.225mL，即为糖原待测液。

试剂配制：

1、0.01 mg/mL 葡萄糖标准品的配制：

按试剂二：双蒸水=1: 99 的体积比混匀，现用现配，2-8℃保存一天。

2、显色剂的配制：

取试剂三粉剂 1 支加25mL 浓硫酸溶解，现用现配，2-8℃避光保存 2 小时。（如颜色较深或发黑，舍弃）

显色剂配制过程中的注意事项：

- ① 浓硫酸浓度必须是 95-98%的分析纯且开瓶不能太久（开瓶太久浓度会降低）。
- ② 配制显色剂的容器和量筒必须绝对干燥，否则会使试剂三无法完全溶解。
- ③ 注意个人保护。

按照下表进行加样：

	空白管	标准管	测定管
双蒸水(mL)	1.0		0.9
0.01mg/mL 标准品(mL)		1.0	
糖原待测液(mL)			0.1
显色液(mL)	2	2	2

充分混匀，沸水浴 5min，取出冷却后混匀，于 620nm 波长，1cm 光径，空白管调零，测各管 OD 值。

注：加完显色液必须充分混匀后再沸水浴，否则会出现絮状物。

结果计算：

1、组织样本计算公式：

$$\text{糖原(mg/g)} = A_{\text{测定}} \div A_{\text{标准}} \times m_{\text{标准}} \times N \times 10 \div 1.11$$

$m_{\text{标准}}$ ：标准管含糖量，0.01mg；

N ：样本测试前稀释倍数，为样本前处理第 2 步中稀释倍数，即肝脏为 100、肌肉为 20(需要注意的是，不同物种肝/肌糖原含量不同，如第一次做本实验，可在制备水解液时统一先制备成 5%浓度的，然后再以预实验看浓度高低，如偏高则再稀释后测定)。

2、细胞样本计算公式：

破碎后水解的细胞计算：

$$\text{糖原(mg/mgprot)} = A_{\text{测定}} \div A_{\text{标准}} \times C_{\text{标准}} \times 10 \div 1.11 \div C_{\text{pr}}$$

$C_{\text{标准}}$ ：标准品浓度，0.01mg/mL；

C_{pr} ：细胞匀浆蛋白浓度，mgprot/mL (prot 指蛋白)。

不破碎直接水解的细胞计算：

$$\text{糖原(mg)} = A_{\text{测定}} \div A_{\text{标准}} \times C_{\text{标准}} \times 10 \div 1.11 \div V_{\text{样总}}$$

$C_{标准}$ ：标准品浓度，0.01mg/mL；

$V_{制备}$ ：制备得到的糖原检测液总体积，0.5mL。

注：10 为检测过程中的稀释倍数(如样本糖原含量较低,也可降低这个稀释倍数或不稀释);**1.11** 为此法测得的葡萄糖含量换算成糖原含量的系数，即 100 μ g 糖原用葱酮试剂显色的颜色相当于 111 μ g 葡萄糖用葱酮试剂显色的颜色。

相关产品推荐	
E1010	液体样本葡萄糖 GLU 含量测定试剂盒 (氧化酶法)
E1009	尿葡萄糖酶法测定试剂盒
E2031	ATP 含量测定试剂盒
E1020	乳酸脱氢酶 LDH 活力测定试剂盒
E2032	液体样本辅酶 I (NAD ⁺ /NADH) 含量检测试剂盒 (WST-8 法)
E2033	组织样本辅酶 I (NAD ⁺ /NADH) 含量检测试剂盒 (WST-8 法)
E2034	液体样本辅酶 II (NADP ⁺ /NADPH) 含量检测试剂盒 (WST-8 法)
E2035	组织样本辅酶 II (NADP ⁺ /NADPH) 含量检测试剂盒 (WST-8 法)
E2063	乳酸 LA 含量检测试剂盒